

长春蒲公英雄性不育株形态学 观察与败育细胞学研究

孙 帅, 张晓嘉, 马 铭, 宁 伟

(沈阳农业大学园艺学院/农业部东北野菜种质异位保存圃与鉴定中心, 沈阳 110866)

摘要:在长春蒲公英(*Taraxacum junpeianum* Kitam.) 株群中发现雄性不育现象, 为研究其败育机理及特点, 探寻其不育基因, 采用形态观察法、石蜡切片技术和染色体压片法, 对长春蒲公英野生型及其雄性不育株的花药发育过程和花粉母细胞减数分裂过程进行了观察。结果表明: (1) 长春蒲公英雄性不育株花药中部发红、干瘪、无花粉散出。与野生型比较, 雄性不育株雄蕊更短, 子房更窄, 种子形态更加狭长; (2) 长春蒲公英雄性不育株败育时期为四分体到单核小孢子前期, 败育方式为小孢子自身异常发育, 绒毡层异常分解, 互相粘连败育; (3) 长春蒲公英雄性不育株花粉母细胞减数分裂二分体时期出现落后微核, 随后产生极少四分体, 并且四分体产生大量染色体桥, 小孢子营养物质流失, 彻底败育。因此, 长春蒲公英雄性不育株败育彻底、稳定, 并且有种的特点。小孢子自身异常发育和绒毡层异常分解是导致败育的主要原因。

关键词: 蒲公英; 雄性不育; 绒毡层; 花粉母细胞

Morphological and Cytological Study on Male Sterile Dandelion (*Taraxacum junpeianum* Kitam.)

SUN Shuai, ZHANG Xiao-jia, MA Ming, NING Wei

(Ex-situ Conservation Garden & Identification Center of Potherb Germplasm in
Northeast China/College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866)

Abstract: Male sterile mutant was observed in *Taraxacum junpeianum* Kitam. To study the property and genes, we investigated anther development and pollen mother cell meiosis of male sterile mutant and wild-type of *Taraxacum junpeianum* Kitam. through morphology, paraffin section and chromosome technique. The results showed that the middle part of anther of male sterile mutant was red and withered without pollens. Compared with wild-type, male sterile mutant had shorter stamens, narrower ovaries, longer and narrower seeds. Abortion stage arose during tetrad to early mononuclear microspore, induced unusual decomposition of tapetum, and mutual adhesion of microspores. Lagged micronucleus was observed during dyad phase of microsporocyte meiosis in male sterile mutant, few tetrads of abounding chromosome bridges were emerged, loss of nutrients happened, leading to abortion of microspore eventually. The male sterility in the dandelion mutant was stable and thorough. Unusual decomposition of tapetum may result in male sterile of dandelion.

Key words: dandelion; male sterile; tapetum; pollen mother cell

蒲公英属为菊科植物, 全世界约有 2000 余小种 (microspecies), 主产北半球温带至亚热带地区, 少数产热带南美洲, 我国约有 70 余种, 其中东北地区

有 11 种^[1], 是我国常见的野生蔬菜和中草药。蒲公英具有清热利胆的功效, 收录于 2010 版《中国药典》^[2]。由于野生的蒲公英资源不能满足对其开发

收稿日期: 2015-06-11 修回日期: 2015-08-19 网络出版日期: 2016-04-06

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20160406.1115.008.html>

基金项目: 国家公益性行业专项 (201407002)

第一作者研究方向为蒲公英无融合生殖研究。E-mail: sunshuai8090@163.com

通信作者: 宁伟, 主要从事药用植物种质资源评价与创新研究。E-mail: synw_01@163.com

利用的需要,蒲公英的栽培和育种研究显得尤为重要。蒲公英具有多种生殖方式,其中以无融合方式为主,但连年的单性繁殖,导致细胞质单一,遗传能力下降,最终会降低质量和产量。目前国内对于药用蒲公英的研究多集中于其化学成分等研究,国外的研究多集中于其无融合生殖方面^[3]。无融合生殖不经过雌雄配子的融合而直接产生后代,这就涉及到了雄配子在无融合生殖方式下的角色问题,既然不需要雄配子,那么雄配子存在的意义是什么,雄配子发育过程有什么特点,蒲公英雄性不育株的雄配子发育又有什么特点,在对蒲公英的研究中,关于雄性不育现象很少有报道,仅张建等^[4]发现蒲公英雄性不育现象,但没有确切的证据支持,对于蒲公英雄性不育产生的原因尚无定论。

基于以上原因,本研究通过对长春蒲公英株群的观察,确证了长春蒲公英中雄性不育现象的存在,并进一步确定了其败育的细胞学原因,以期对蒲公英育种及不育基因的操作奠定理论基础,丰富无融合生殖方式物种的蒲公英生殖进化过程中能量流向分配的理论。

1 材料与方法

1.1 材料

以模拟野外生态条件进行人工栽培的长春蒲公英群体中出现的雄性不育株为试验材料,同时以长春蒲公英野生型可育株为对照株(CK)。长春蒲公英(*Taraxacum junpeianum* Kitam.)经由中科院沈阳生态研究所李冀云研究员鉴定,仿野生栽培于沈阳农业大学东北野菜种质异位保存圃,样品标本保存于沈阳农业大学东北野菜种质异位保存圃与鉴定中心标本馆(SYAB),常规实验田管理。

1.2 方法

1.2.1 花部综合特征观察 2014年4-5月,随机挑取盛花期的长春蒲公英雄性不育株及其对照株各10株,每株随机取3朵花,每朵花上随机取5枚花药,在Motic体视显微镜下观察并拍照。

随机挑取10株,每株随机取3朵花序。用游标卡尺分别测量盛花期花部综合特征,测定指标和标准参照施展等^[5]的方法。数据经EXCEL 2003和SPSS 19.0分析处理。

1.2.2 花药发育观察 于晴天9:00-11:30期间随机采集盛花期的长春蒲公英雄性不育株及其对照株不同时期的花药。花药分级标准参照张雁^[6]的桔

梗分类标准。采用石蜡切片技术处理样品。在Olympus PH型显微镜下观察并拍照,图片经Adobe Photoshop 7.0处理。

1.2.3 花粉母细胞减数分裂观察 取材方法参照1.2.2,花药经卡诺固定液固定24h后,分别逐级转入95%、90%和80%无水乙醇溶液中各0.5h,最后用70%的无水乙醇溶液于4℃下长期保存。

用医用镊子撕下3~4朵舌状小花,蒸馏水冲洗干净,放于滴有70%无水乙醇溶液的载玻片上。去掉舌片、子房和柱头,用医用镊子轻轻挑破花药并捣碎,挤出花粉母细胞,最后滴上1滴改良卡宝品红溶液,室温静置30s,盖上盖玻片。Olympus PH型显微镜下观察,CCD照相,图片经Adobe Photoshop 7.0处理。

2 结果与分析

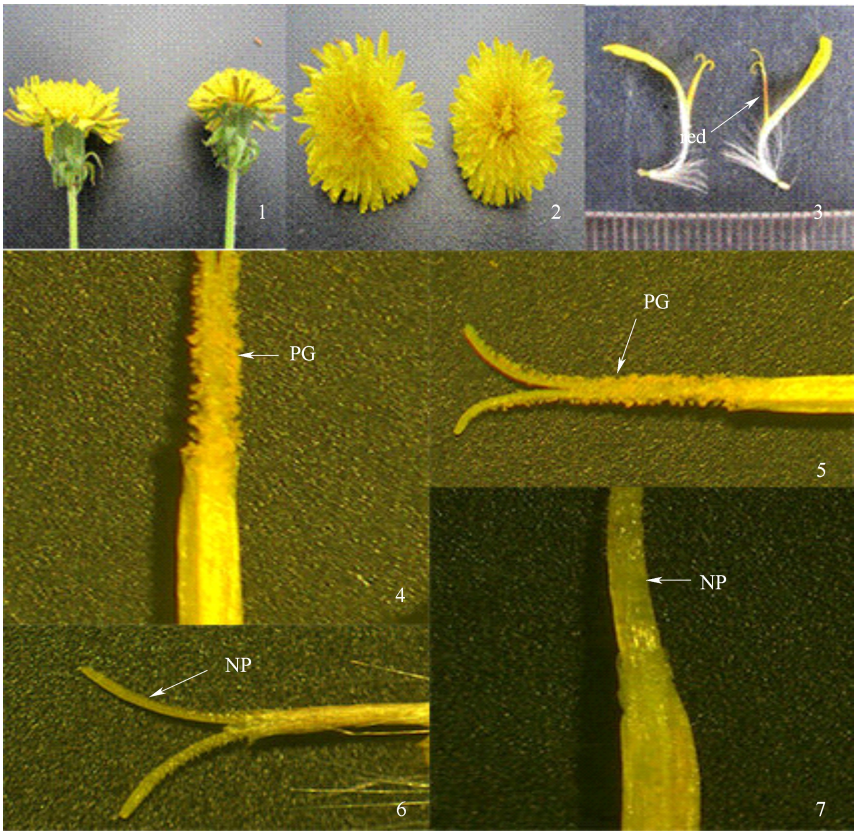
2.1 长春蒲公英雄性不育株花药形态观察

长春蒲公英花药为聚药雄蕊,柱头在不断伸长过程中突破花药,花柱毛将大量成熟花粉顶出花药进行传播(图1-4,5)。相同生长环境下,对比观察长春蒲公英野生型和雄性不育株的聚药雄蕊形态学差异,发现雄性不育株的花药更加瘦小,并且花药中部呈红色(图1-3)。放大观察下,长春蒲公英野生型有大量的花粉聚集在花柱及柱头上,花柱中部花粉聚集量最大(图1-4,5),而长春蒲公英雄性不育株花柱及柱头上无花粉(图1-6,7)。

长春蒲公英野生型与雄性不育株在花冠宽度、子房长、种子长、种子宽(侧面)等指标的差异没有统计学意义,在雄蕊长度、花粉粒大小、子房宽、种子宽(正面)等指标的差异有统计学意义(表1)。与野生型比较,雄性不育株雄蕊更短,子房更窄,种子形态更加狭长,其中雄性不育株子房宽度仅为野生型的79%。野生型产生大量的花粉,但长春蒲公英为三倍体蒲公英^[7],花粉粒大小变化较大(表1)。长春蒲公英雄性不育株开花后,不能产生正常花粉,花粉粒大小无法测定。

2.2 长春蒲公英雄性不育株和野生型花药发育过程

2.2.1 长春蒲公英野生型花药发育过程 长春蒲公英野生型花药由最开始的雄蕊原基,经过平周分裂和垂周分裂分化出花药原始体,形状为椭圆形(图2-1)。花药原始体的4个角开始分化,花药原始体变成四棱状。4个角的表皮下有1个或几个细



1~3 分别为两类蒲公英聚药雄蕊侧面对比,聚药雄蕊正面对比,单个舌状花对比(左:野生型;右:不育株);
4~5 为长春蒲公英野生型单个舌状花;6~7 为长春蒲公英雄性不育株单个舌状花
1-3 refer to the contrast of two types of taraxucum in lateral side of synantherous stamen, right side of
synantherous stamen, Ligulate flower(left: Wild-type, right: Male sterile mutant) . 4-5 is ligulate flower of wild-type.
6-7 is ligulate flower of male sterile mutant(PG: Pollen grain, NP: No pollen grain)

图1 长春蒲公英雄性不育株和野生型柱头形态对比图

Fig. 1 Comparison of stigmatic morphology of male sterile mutant and wild-type plants of *T. junpeianum* Kitam.

表 1 长春蒲公英雄性不育株和长春蒲公英野生型花部综合特征

Table 1 Floral traits of male sterile mutant and wild-type of plants of *T. junpeianum* Kitam.

类型	花冠宽度(mm)	雄蕊长度(mm)	花粉粒大小 (μm)	子房长(mm)	子房宽(mm)	种子长(mm)	种子宽(正面) (mm)	种子宽(侧面) (mm)
Type	Corolla width	Pistil length	Pollen grain size	Ovary length	Ovary width	Seed length	(mm)Seed width	(mm)Seed width
1	$25.50 \pm 3.62\text{a}$	$3.44 \pm 0.39\text{a}$	0a	$1.54 \pm 0.77\text{a}$	$0.53 \pm 0.06\text{a}$	$3.34 \pm 0.32\text{a}$	$0.76 \pm 0.06\text{a}$	$0.54 \pm 0.04\text{a}$
2	$25.95 \pm 2.80\text{a}$	$4.10 \pm 0.18\text{b}$	$28.4 \pm 6.43\text{b}$	$1.43 \pm 0.12\text{a}$	$0.67 \pm 0.05\text{b}$	$3.13 \pm 0.10\text{a}$	$0.91 \pm 0.09\text{b}$	$0.58 \pm 0.05\text{a}$

1: 长春蒲公英雄性不育株;2: 长春蒲公英野生型

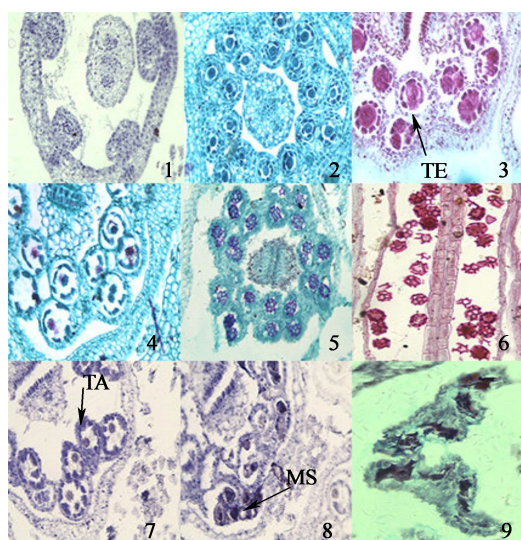
1: Male sterile mutant, 2: Wild-type

胞质浓厚的孢原细胞,孢原细胞进一步分裂成造孢细胞,最后形成小孢子母细胞(图 2-2)。小孢子母细胞时期,每个花药的 4 个药室基本分化完成,3 层结构明显,由外到内分别为表皮、中层、绒毡层,内含小孢子母细胞(图 2-2)。小孢子母细胞之后经历一个减数分裂的过程,依次经过二分体时期和四分体时期。四分体时期前后,药室内绒毡层细胞开始变

成多核,并且开始解体,为小孢子提供营养(图 2-3)。随着小孢子的发育,绒毡层进一步解体,单核小孢子时期,仅剩下少量细胞残留物(图2-4)。花粉成熟时期,除表皮细胞之外,中层和绒毡层均完全解体(图 2-5,6),之后花药表皮破裂,花粉散出。

2.2.2 长春蒲公英雄性不育株花药发育过程 长

春蒲公英雄性不育株花药发育从雄蕊原基到四分体之前和野生型差异不明显,四分体之后二者差异明显,主要表现在绒毡层和小孢子位置上。四分体之后,雄性不育株绒毡层排列变得不规则,并且有边缘结构模糊现象。花药结构变形,小孢子有的靠近药室边缘,并且难以染色,形状变得不规则(图2-7)。随后,绒毡层和花药结构进一步变形,小孢子变得更加不规则并且发生严重的粘连现象,不育特征尤其明显(图2-8)。最后花药结构完全变形,仅能分辨出小孢子的大概位置,并且药室粘连严重,彻底败育(图2-9)。



1~6 分别为长春蒲公英野生型花药原始体,花粉母细胞时期,四分体时期,单核小孢子时期,成熟花粉时期,成熟花粉时期;7~9 分别为长春蒲公英雄性不育株单核小孢子早期,单核小孢子时期,败育花药(放大倍数

1~8 为 4×10 , 9 为 4×40)

1-6 refer to anther primordial, microspore mother cell phase, tetrad phase, mononuclear microspore phase, mutual pollen period, mutual pollen period of wild-type, 7-9 refer to early mononuclear microspore phase, late mononuclear microspore phase, degradation anther of male sterile mutant (TE: Tetrad, TA: Tapetum, MS: Microspore) (Magnification: 1-8: 4×10 , 9: 4×40)

图2 长春蒲公英雄性不育株和野生型花药发育的各个阶段
Fig. 2 Stages of anther development of male sterile mutant and wild-type plants of *T. junpeianum* Kitam.

2.3 长春蒲公英雄性不育株和野生型花粉母细胞减数分裂过程

2.3.1 长春蒲公英野生型花粉母细胞减数分裂

细线期染色质逐渐变成细长的染色质丝,交错分布在细胞内(图3-3)。偶线期,染色体开始超螺旋化,

染色体开始相互交织在一起(图3-4)。粗线期和双线期,基因大规模交换,形成种基因的丰富性。终变期,所有的染色体凝结在一起呈棒状,超螺旋程度达到最大化(图3-5)。纺锤丝的出现将同源染色体一分为二,拉向两极,进入减数分裂 I 中期和后期,末期细胞形成二分体(图3-6)。

减数分裂 I 期结束后细胞很快进入减数分裂 II 期,纺锤丝再一次出现,将姐妹染色体单体互相分开,拉扯形成4个独立的单倍体(图3-7)。绒毡层的分解,释放大量的胼胝质酶将四分体期的小孢子互相分离开,形成单个小孢子(图3-8)。单独分离开的小孢子被胼胝质壁包围,无法同外界进行营养交流。之后经历一个收缩期,小孢子表面开始沉积绒毡层分解出来的孢粉素,小孢子表面开始逐渐形成条脊,具有种的特点(图3-9)。最后形成带有沟壑结构的成熟花粉粒(图3-10),分散在花药里(图3-11)。

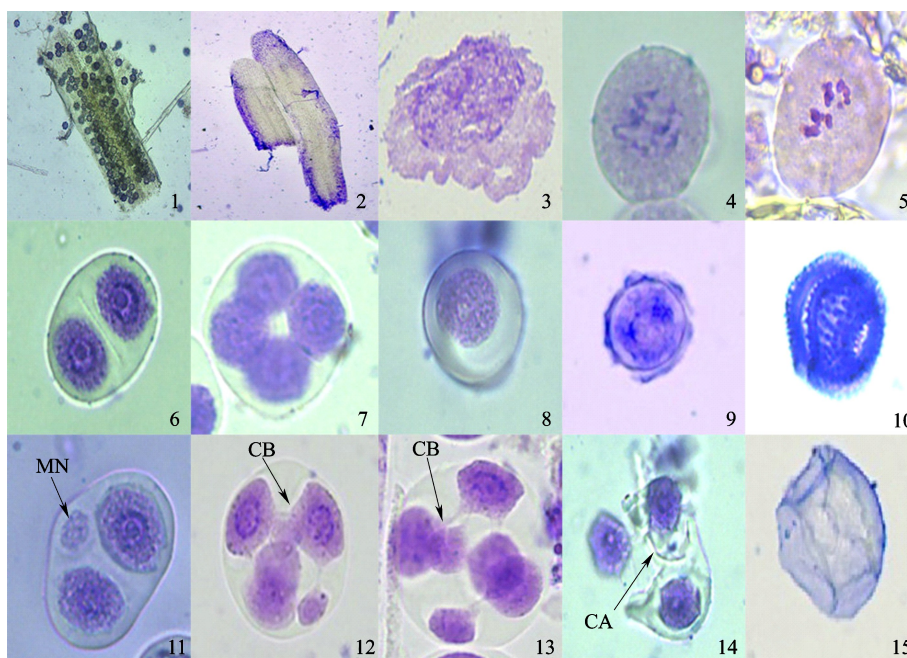
2.3.2 长春蒲公英雄性不育株花粉母细胞减数分裂

长春蒲公英雄性不育株花粉母细胞减数分裂从间期到前期,与野生型并无明显差异。从减数分裂 I 中期开始,花粉母细胞的数目显著少于野生型的花粉母细胞数目,雄性不育株只剩下少数花粉母细胞,并且二分体期,仅存的花粉母细胞大都具有微核(图3-11),导致染色体丢失。进一步的减数分裂,四分体期,花粉母细胞数目更少,并且几乎全部存在染色体桥的现象(图3-12,13),此时绒毡层不正常分解,导致小孢子不能正常分离(图3-14),分离出来的极少的小孢子细胞很快营养流失,形成空瘪的小孢子壳和空囊花药(图3-2),最终完全败育(图3-15)。

3 讨论

3.1 长春蒲公英雄性不育株的发现

高等植物中存在大量的未能分化出正常花粉的现象,即雄性不育的现象,其中人们关注的热点一直在禾本科和茄科的大田作物,以及十字花科的蔬菜类作物上^[8]。P. J. Van Dijk 等^[9]曾在蒲公英属中发现二倍体雄性不育植株。P. G. Meirmans 等^[10]也曾在野外发现二倍体雄性不育植株,并且在杂交试验中培育出三倍体雄性不育蒲公英,进而提出三倍体雄性不育蒲公英在野外存在的可能性。沈阳农业大学野菜课题组首次在长春蒲公英中发现雄性不育的现象,并且雄性不育株在种群中最高出现频率达到 8.99%^[7]。



1~2 分别为长春蒲公英野生型充满花粉粒的花药和雄性不育株空瘪的花药;3~10 分别为长春蒲公英野生型细线期,偶线期,中期 I (极面观),二分体时期,四分体时期,刚释放的小孢子,小孢子单核居中期,成熟花粉粒;11~15 分别为长春蒲公英雄性不育株二分体时期,四分体时期,四分体时期,刚释放的扭曲小孢子,败育的小孢子壳(扭曲的核质)

1-2 refer to anther of wild-type with pollens and empty anther of male sterile mutant without pollen, 3-10 refer to leptotene, zygotene, metaphase I (polar view), dyad, tetrad, just released microspores, central nucleus microspore, mutual pollen of wild-type, 11-15 refer to dyad, tetrad, tetrad, just released distorted microspores, abortion microspore putamen (distorted nucleus and cytoplasm) of male sterile mutant (MN: Micronucleus, CB: Chromosome bridge, CA: Callose)

图 3 长春蒲公英雄性不育株和野生型花粉母细胞减数分裂过程

Fig. 3 Meiosis of pollen mother cells of male sterile mutant and wild-type plants of *T. junpeianum* Kitam.

3.2 长春蒲公英雄性不育株败育发生时期及特点

花粉的发育过程是植物自身大量基因和能量在时间和空间上严格分配和利用的过程,仅花器官的特有 mRNA 就有近 1 万种左右,而这些 RNA 仅占总 RNA 的万分之一^[11]。植物从花蕊原基到成熟花粉的过程涉及大量生理、生化和环境相互配合的过程,其中任何时期出现紊乱或错误,都会导致雄性不育的产生。这也表明,植物的雄性不育败育时期和特点是多种多样的^[12]。一般认为双子叶植物不育系花粉败育高峰多发生在造孢细胞至四分体期^[13]。陈雪平等^[14]在对 3 种茄子雄性不育系材料的研究中发现,花粉败育可发生在减数分裂 I 前期和小孢子期。本研究中,长春蒲公英雄性不育株花粉败育可发生在四分体到单核小孢子前期,亦说明了雄性不育发生时期的多样性。组织切片和花粉压片结果共同证实,绒毡层非正常时期的溶解和异常结构可能是导致长春蒲公英雄性不育株花药败育的关键因

素。绒毡层作为“哺育组织”,参与花粉发育的整个过程。在花药发育初期,绒毡层提供了大部分的营养元素^[15-16];在四分体期,绒毡层提供花药发育的特异性胼胝质酶^[17];在外壁发育期,绒毡层提供孢粉素及后期的脂类成分等^[18]。小孢子形成过程中的每个步骤,从各个方面证实都与绒毡层的协同发育有关,绒毡层在生长及增殖的时候,很可能发生不适时的降解、过度液泡化、壁组织横向增大及异常分化等表现^[14,19],将直接导致不育。本研究组织切片结果证实,四分体前后,绒毡层结构变得模糊,绒毡层细胞开始流失,不能提供足够的胼胝质酶和孢粉素去沉积到小孢子上。同时绒毡层细胞自身结构逐渐发生异常,体内出现许多的液泡结构,结构变形。最后使小孢子发生粘连,四分体不能正常分离和发育,二者同时降解,只留下模糊的原生质团结构,这和压片结果中四分体小孢子不同时分解和后期发生自溶现象相吻合。

3.3 蒲公英雄性不育与其专性无融合生殖方式的关联

蒲公英植物有其自身独特的生殖生长过程,在自身能量和资源分配上产生独特的特点。长春蒲公英为三倍体植株,并且具有专性无融合的特性^[4],即无需雄配子与卵细胞的融合,直接由中央极核和未减数分裂的卵细胞形成胚乳和胚。在长春蒲公英生殖生长过程中,可以直接绕过雄性器官而直接产生种子。这种生殖方式在长期进化过程中,为了节约更多能量和达到自身资源分配最优化,植物将更多能量分配到雌性器官发育过程中,而逐渐减少分配到雄性器官的能量,导致其雄性器官有逐渐退化的趋势,从而降低无用能量和物质的输出^[20]。该理论和 P. G. Meirmans^[10] 猜测理论上专性无融合植物最后进化为雄性不育植物理论一致。本研究中观察到长春蒲公英雄性不育现象,这是否说明长春蒲公英种群最终会变为雄性不育种群,这是进化还是退化,这些问题都有待进一步深入研究。同时对于雄性不育状态下专性无融合种大孢子的发育是否发生变化,这种雄性不育是如何产生的,又是如何稳定下来的,是核质互作遗传,还是细胞核遗传仍有待进一步验证。

参考文献

- [1] 中国科学院《中国植物志》编委会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1999
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 331
- [3] Musial K, Koscinska-Pajak M, Antolec R, et al. Deposition of callose in young ovules of two *Taraxacum* species varying in the mode of reproduction[J]. *Protoplasma*, 2015, 252(1): 135-144
- [4] 张建, 邢艳萍, 赵鑫, 等. 长春蒲公英花部综合征与繁育系统研究[J]. 种子, 2013, 32(5): 17-19
- [5] 施展, 万正杰, 徐跃进, 等. 大白菜新型细胞质雄性不育系 6w-9605A 的育性鉴定和花药败育的细胞学观察[J]. 植物科学学报, 2012, 30(1): 49-54
- [6] 张雁. 桔梗花粉母细胞减数分裂及雄性败育的细胞生理学研究[J]. 西北植物学报, 2013, 33(7): 1339-1347
- [7] 张建. 蒲公英属植物繁殖生物学研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2013
- [8] Kaul M L H. Male sterility in higher plants[M]. Berlin and Heidelberg: Springer-Verlag, 1988: 32-33
- [9] Van Dijk P J, Van Baarlen P, De Jong J H. The occurrence of phenotypically complementary apomixis-recombinants in crosses between sexual and apomictic dandelions (*Taraxacum officinale*) [J]. *Sex Plant Reprod*, 2003, 16: 71-76
- [10] Meirmans P G, Den Nijs H (J) C M, Van Tienderen P H. Male sterility in triploid dandelions: asexual females vs asexual hermaphrodites[J]. *Heredity*, 2006, 96(1): 45-52
- [11] Kamalay J C, Goldberg R B. Regulation of structural gene expression in tobacco[J]. *Cell*, 1980, 19(4): 935-946
- [12] Laser K D, Lersten N R. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms[J]. *Bot Rev*, 1972, 38(3): 425-454
- [13] 朱英国. 水稻雄性不育生物学[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 2000: 3-4, 234-243, 280-281
- [14] 陈雪平, 罗双霞, 轩淑欣, 等. 茄子雄性不育系花粉败育的细胞学观察[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(4): 754-758
- [15] Nave E B, Sawhney V K. Enzymatic changes in post-meiotic anther development in *Petunia hybrida*. I. anther ontogeny and isozyme analyses[J]. *J Plant Physiol*, 1986, 125(5): 451-465
- [16] Mascarenhas J P. Gene activity during pollen development[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 1990, 41(1): 317-338
- [17] 胡适宜. 被子植物胚胎学[M]. 北京: 人民教育出版社, 1982
- [18] Piffanelli P, Ross J H E, Murphy D J. Biogenesis and function of the lipidic structures of pollen grains[J]. *Sex Plant Rep*, 1998, 11(2): 65-80
- [19] Engelke T, Hülsmann S, Tatlioglu T. A comparative study of microsporogenesis and anther wall development in different types of genic and cytoplasmic male sterilities in chives[J]. *Plant Breeding*, 2002, 121(3): 254-258
- [20] Van der Hulst R G M, Meirmans P, Van Tienderen P H, et al. Nuclear-Cytoplasmic male-sterility in diploid dandelions[J]. *Heredity*, 2004, 93: 43-50